

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tomáš Kozel

Cirkadiánní systém sítnice

Circadian system of the retina

Bakalářská práce

Školitelka: doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2016

Poděkování:

Velmi rád bych poděkoval své školitelce doc. RNDr. Zdeňce Bendové, PhD., za vedení, odborné rady a vstřícný přístup při psaní bakalářské práce, dále mé přítelkyni, rodině a přátelům za trpělivost a podporu, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2016

Tomáš Kozel

Abstrakt

Většina organismů se v průběhu evoluce přizpůsobila dennímu 24hodinovému rytmu. Tento, tzv. cirkadiánní, rytmus jsou organismy schopny dodržovat i v podmínkách, kde nemají přístup ke světelnému ani jinému synchronizátoru. Hlavní orgán řídící cirkadiánní rytmus je lokalizován v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu a dlouhou dobu byl považován za jediný autonomní cirkadiánní oscilátor, na jehož funkci závisí rytmicita procesů v tělních buňkách a tkáních. Nové výzkumy ovšem tuto hypotézu zpochybnily a ukázaly existenci lokálních cirkadiánních hodin nezávislých na SCN. Jedním z těchto autonomních oscilátorů je i cirkadiánní systém v retině. Tato bakalářská práce shrnuje vědecké poznatky o funkci savčího retinálního cirkadiánního oscilátoru, především se zaměřuje na nové výzkumy v oblasti jeho lokalizace, propojení s hlavním cirkadiánním oscilátorem v SCN a jeho vlivu na retinální fyziologii.

Klíčová slova

cirkadiánní systém, sítnice, hodinové geny, synchronizace, melanopsin, melatonin

Abstract

Most of the known living organisms have developed an evolutionary adaptation to a 24-hour daily rhythm. This rhythm, known as circadian rhythm, can be preserved even in the environment, in which there is no access to light or other synchronizer. The master organ of circadian rhythm is located in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) and have been considered the only autonomous circadian oscillator for a long time. The new research, however, has doubted this hypothesis by showing the existence of autonomous circadian clock systems independent of SCN. One of these autonomous clocks is the circadian system in the retina. This bachelor thesis reviews current scientific knowledge on the function of mammalian retinal circadian oscillator, most importantly in the field of its localization, connection with the SCN master circadian oscillator and its influence on retinal physiology.

Key words

circadian system, retina, clock genes, synchronization, melanopsin, melatonin

Obsah

Seznam zkratek.....	1
1. Úvod.....	3
Cíle práce.....	3
2. Cirkadiánní systém.....	4
2.1. Hlavní cirkadiánní oscilátor.....	4
2.2. Vliv hlavního cirkadiánního oscilátoru na periferní cirkadiánní oscilátory	6
2.3. Molekulární podstata cirkadiánní oscilace.....	7
2.4. Post-transkripční a post-translační regulace exprese hodinových genů.....	9
3. Sítnice.....	11
3.1. Stavba sítnice	11
4. Cirkadiánní systém v sítnici	13
4.1. Ovlivnění SCN autonomními retinálními cirkadiánními hodinami.....	15
4.2. Syntéza neuromodulátorů v retině	16
4.3. Vliv cirkadiánních hodin v retině na zrakové funkce	21
4.4. Nitrooční tlak	23
4.5. Vnitřní retinální hodiny a retinální patofyziologie	24
5. Závěr.....	24
6. Literatura	26

Seznam zkratek

AAAD	aromatická-L-amino dekarboxylázová kyselina
AANAT	akrylamin-N-acetyltransferáza
AVP	arginin vasopresin
BC	bipolární buňka (<i>bipolar cell</i>)
b-HLH	motiv základní helix-loop-helix
BMAL1	brain and muscle Arnt-like protein 1
CALB	calbindin
cAMP	cyklický adenosin 3', 5' monofosfát
CAR	calretinin
CIRBP	cold-inducible RNA-binding protein
CK	kaseinová kináza
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
CREB	cAMP response element-binding protein
CRY	cryptochrome
FUS	fused in sarcoma
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GCL	vrstva gangliových buněk
GRP	gastrin-uvolňující peptid (gastrin-releasing peptide)
HC	horizontální buňka (<i>horizontal cell</i>)
IGL	intergeniculární lístek talamu (<i>intergeniculate leaflet</i>)
INL	vnitřní jaderná vrstva (<i>inner nuclear layer</i>)
ipRGC	fotosenzitivní retinální gangliová buňka (<i>intrinsically photosensitive retinal ganglion cell</i>)
KO	knockout
LD	light dark
MAPK	mitogeně aktivovaná proteinová kináza
MT1/2	melatoninový receptor 1. /2. typu
NPAS2	neuronální PAS-doménový protein 2, (<i>neuronal PAS domain-containing protein 2</i>)
ONL	zevní jaderná vrstva (<i>outer nuclear layer</i>)

OPL	zevní plexiformní vrstva (<i>outer plexiform layer</i>)
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAS	motiv PER-ARNT-SIM
PER	cirkadiánní protein period (<i>period circadian protein</i>)
PER2::LUC	gen PERIOD 2::LUCIFERASE
PKA	proteinkináza A
PP1/5	proteinová fosfatáza 1/5
RHT	retinohypotalamický trakt
RORa/b/c	retinoid-related orphan receptors
ROS	vnější segmenty tyčinek (<i>rod outer segments</i>)
RPE	retinální pigmentový epitel (<i>retinal pigment epithelium</i>)
SCN	suprachiasmatická jádra (<i>suprachiasmatic nukleus</i>)
TH	tyrosin hydroláza
VIP	vasoaktivní intestinální polypeptid (<i>vasoactive intestinal polypeptide</i>)
ZT	Zeitgeber time (denní doba, kdy byl aplikován vnější synchronizátor)

1. Úvod

Střídání dne a noci, společně se střídáním ročních období, jsou pravidelné rytmy na planetě Zemi, kterým se v průběhu evoluce život přizpůsobil. Aby se organismy mohly lépe připravit na periodicky se měnící podmínky prostředí, ve kterém žijí, vytvořily si schopnost orientovat se v čase. Tato pro život zcela zásadní schopnost byla již v minulém století předmětem intenzivního zájmu vědců, kteří se snažili pochopit mechanismus její podstaty. Hlavní molekulární mechanismus byl sice u hlavních modelových organismů včetně savců objasněn již v počátku 90. let, ovšem většina fyziologických i behaviorálních pochodů v těle organismů vykazuje denní rytmicitu, a proto jsou i nadále aktuálním tématem vědeckého výzkumu. V popředí zájmu jsou především souvislosti synchronizace cirkadiánní rytmicity a patologických stavů vznikajících z jejího narušení.

Hlavní cirkadiánní pacemaker, který řídí přibližně 24hodinové rytmy celé řady fyziologických funkcí, je lokalizován v suprachiasmatických jádrech (SCN) hypotalamu. Ve vědecké literatuře dlouho panovala shoda v tom, že suprachiasmatická jádra řídí synchronizaci času ve všech důležitých tělních buňkách, ovšem novější výzkumy tuto hypotézu vyvrátily a popsaly několik nezávislých periferních oscilátorů schopných samostatné funkce bez propojení se suprachiasmatickými jádry. Jedním z těchto autonomních oscilátorů je i cirkadiánní pacemaker v sítnici, který funguje nezávisle na SCN a řídí fyziologické procesy v sítnici důležité pro funkci zraku.

Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je přehledně shrnout současné vědecké poznatky o autonomním cirkadiánním oscilátoru v retině savců. V prvních dvou kapitolách práce bude pojednáno o hlavním cirkadiánním oscilátoru v suprachiasmatických jádrech hypotalamu a struktuře a funkci sítnice, aby tyto zásadní teoretické informace mohly být využity v nosné části bakalářské práce. V kapitole věnované cirkadiánnímu rytmu v retině budou popsány okolnosti jeho objevu, jeho lokalizace v retině, jeho vliv na retinální funkce a možné souvislosti cirkadiánního oscilátoru retiny s retinálními chorobami.

2. Cirkadiánní systém

Molekulární mechanismus, který zajišťuje pravidelné cykly autonomních cirkadiánních hodin, je postaven na expresi hodinových genů a jejich produktů. Hodinové geny jsou soubor genů, který zajišťuje pravidelnou rytmicitu molekulárních a biochemických procesů v buňce nastavením „volně běžící“, přibližně čtyřadvacetihodinové cirkadiánní periody (Panda et al., 2002). Tyto molekulární hodiny se nachází téměř v každé buňce organismu. Cirkadiánní hodiny v periferních orgánech ale mají specifickou hierarchii.

Endogenní cirkadiánní rytmy organismu je nutné synchronizovat s cyklem okolního prostředí. Jako nejsilnější synchronizátor pro cirkadiánní rytmus funguje světelný impuls. Ačkoli svůj podíl na synchronizaci má také zvuk (Amir and Stewart, 1996), sociální interakce (Aschoff et al., 1971) či další faktory (Klerman et al., 1998), nic z toho není efektivnější než světlo, které je pro živé organismy evolučně důležité (Etingof, 1997).

Světlo je nejprve přijato sítnicí oka a poté vedeno do SCN skrze přímou dráhu retinohypotalamického traktu (RHT) (Moore et al., 1995). Za dva hlavní neurotransmitery RHT jsou považovány aminokyselina glutamát a polypeptid PACAP (z angličtiny – pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) (Hannibal et al., 2000).

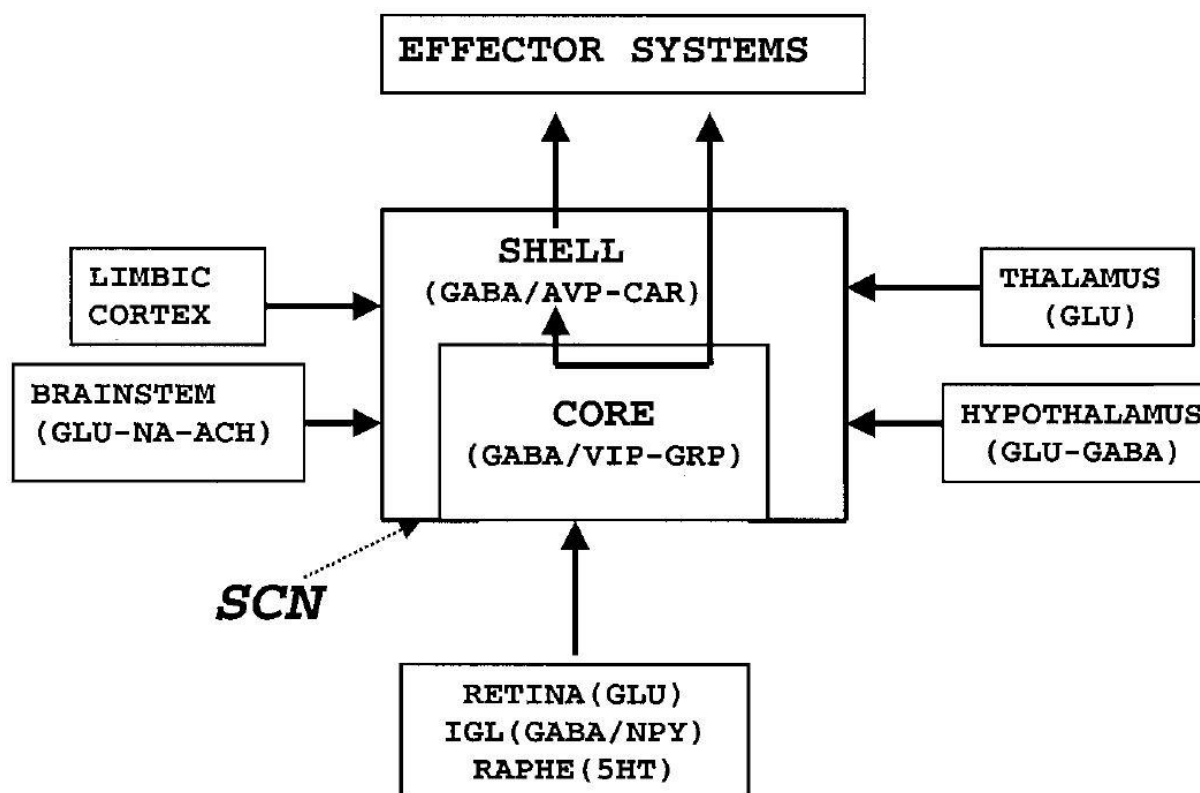
2.1. Hlavní cirkadiánní oscilátor

Počátky výzkumu cirkadiánních rytmů položil Pittendrigh (1960), který jako jeden z prvních přišel s myšlenkou světlocitlivého oscilátoru zajišťujícího synchronizaci fyziologických a behaviorálních dějů v organismu. Následující výzkumy identifikovaly tento oscilátor v párové struktuře v hypothalamu, umístěné nad křížením očních nervů, v suprachiasmatických jádrech (SCN) (Moore and Eichler, 1972).

Jako sídlo centrálních cirkadiánních hodin savců byla SCN definitivně potvrzena na počátku 80. let, a to současně dvěma nezávislými týmy – Roberta Y. Moora (1972) a Irvinga Zuckera (1972). Roku 1987 laboratoř Michaela N. Lehmana provedla experiment, kdy křečkům nejprve provedla lézi SCN, v důsledku čehož zvířata ztratila pravidelný rytmus lokomoční aktivity. Následně jim pak byla implantována nová tkáň, obsahující SCN, a rytmus lokomoční aktivity se opět vrátil do normálu (Lehman et al., 1987). Další experimenty, ve kterých byla SCN izolována či pěstována *in vitro*, prokázaly cirkadiánní rytmus ve frekvenci elektrických vzruchů uvnitř samotné tkáně (Bos and Mirmiran, 1990; Green and Gillette, 1982; Groos and Hendriks, 1982).

Zajímavostí je, že role SCN byla objevena náhodou, během výzkumů světelné synchronizace rytmu u savců (Meijer and Rietveld, 1989; Moore, 1983). Léze SCN nezpůsobila narušení zrakového vnímání, jak se původně předpokládalo, ale zrušila cirkadiánní rytmy, což vedlo k zjištění, že hlavním cirkadiánním oscilátorem je právě SCN (Moore, 1997; Weaver, 1998).

Savčí SCN jsou uloženy v anteroventrálním hypotalamu jako párové struktury nad křížením optických nervů neboli *chiasma opticum* (Abrahamson and Moore, 2001). Jde o shluky přibližně 20 000 neuronů, které společně tvoří vysoce propojenou nervovou tkáň (Mohawk and Takahashi, 2011). SCN má dvě anatomicky a funkčně specifické oblasti: ventrolaterální oblast, takzvané „jádro“ (z anglického *core*), která přisedá přímo na křížení optických nervů a přijímá signál ze sítnice vedený retinohypotalamickým traktem (RHT), a také signály z intergenikulárního listku talamu (IGL) a serotonergních jader mozkového kmene. Dorzomediální část SCN je označována jako „obal“ (z anglického *shell*), obklopuje oblast „jádra“ a přijímá její vstupy.

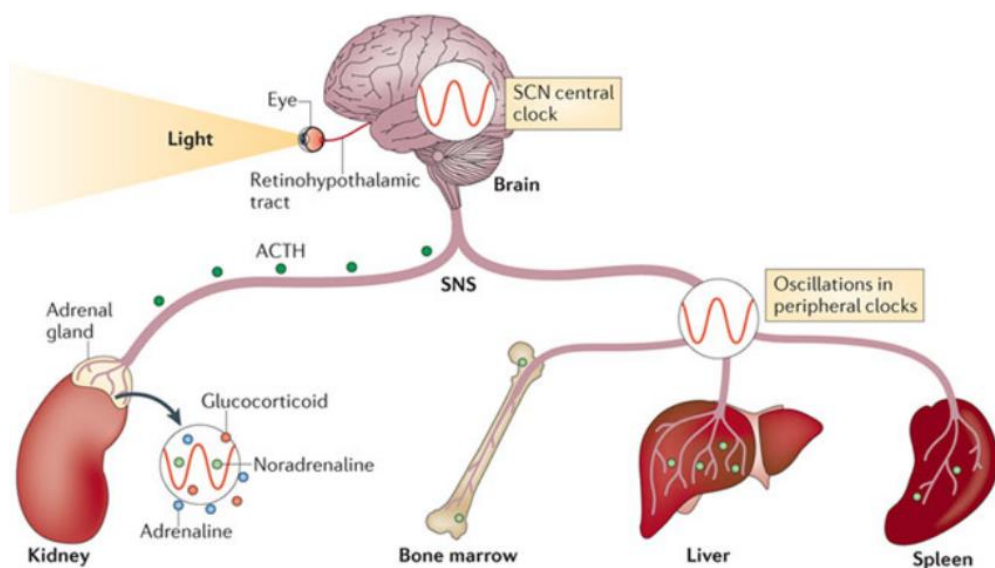


Obrázek 1. Diagram vstupních a výstupních signálů SCN. ACH – acetylcholin, AVP – arginin vasopresin, CAR – calretinin, GABA – γ -aminomáselná kyselina, GLU – glutamát, GRP – gastrin-uvolňující peptid, NA – noradrenalin, NPY – neuropeptid Y, VIP – vazoaktivní intestinální peptid, 5-HT – serotonin. Převzato z Moore et al., 2002.

Neurony „jádra“ i „obalu“ syntetizují neuropřenašeč GABA, rozdíl však najdeme v syntéze vazoaktivního intestinálního peptidu (VIP) a gastrin-uvolňujícího peptidu (GRP), který nalezneme pouze v oblasti „jádra“. Výstupy pak vysílá do oblasti obalu a část z nich také vysílá do efektorových oblastí. Pro „obal“ je specifická syntéza arginin vazopresinu (AVP) a calretininu (CAR), impulzy přijímá z hypothalamu, thalamu, limbické kůry, mozkového kmene i z oblasti jádra samotného SCN. Efektorové oblasti pak signálem zásobuje přímo (obr. 1) (Abrahamson and Moore, 2001).

2.2. Vliv hlavního cirkadiálního oscilátoru na periferní cirkadiální oscilátory

Cirkadiálními hodinami jsou řízeny všechny tělní buňky. Objev, že nejen buňky SCN jsou schopné vykazovat autonomní cirkadiální rytmus skrze genovou expresi, naznačil, že tkáně mohou rytmicky regulovat specifické fyziologické a behaviorální procesy (Dibner et al., 2010; Welsh et al., 2010). Hlavní cirkadiální pacemaker v SCN hypothalamu přijímá světelné signály přicházející z retiny a na jejich základě synchronizuje periferní cirkadiální hodiny, například v játrech, žaludku, kostní dřeni, slezině, plicích nebo ledvinách (obr. 2). Hodiny v periferních tkáních většinou využívají stejné molekulární mechanismy jako hlavní hodiny v SCN. Synchronizaci lokálních periferních hodin zajišťuje SCN jednak prostřednictvím behaviorálních signálů (např. nastolením klidového vs. aktivního režimu), jednak spoluprací hormonální signalizace s autonomními nervy (shrnutí v Albrecht, 2012). Některé z těchto lokálních hodin jsou významně propojeny s metabolickými drahami a současný výzkum naznačuje možnou spojitost dysfunkce cirkadiálních rytmů s rozvojem obezity, rakoviny nebo diabetu II. typu (Dallmann et al., 2012).



Obrázek 2. Synchronizace periferních oscilátorů hlavním cirkadiálním pacemakerem v SCN. Převzato z Scheiermann et al., 2013, upraveno.

2.3. Molekulární podstata cirkadiánní oscilace

První hodinový gen byl objeven v sedmdesátých letech u *Drosophily melanogaster*. Šlo o gen *Per*, který se podařilo u tří jedinců mutovat a v důsledku toho způsobit abnormální periodu životních rytmů (Konopka and Benzer, 1971). Objev odstartoval další výzkumy, které měly za cíl zjistit přítomnost hodinových genů i u vyšších živočichů a vysvětlit jejich fungování.

První hodinový gen u savců byl identifikován na základě mutantní myši, která při mutaci v genu *Clock* vykazovala změny v rytmicitě a délce periody cirkadiánních pochodů (Vitaterna et al., 1994). Přesnou funkci genu *Clock* následně vysvětlil výzkum na přelomu tisíciletí (Gekakis et al., 1998).

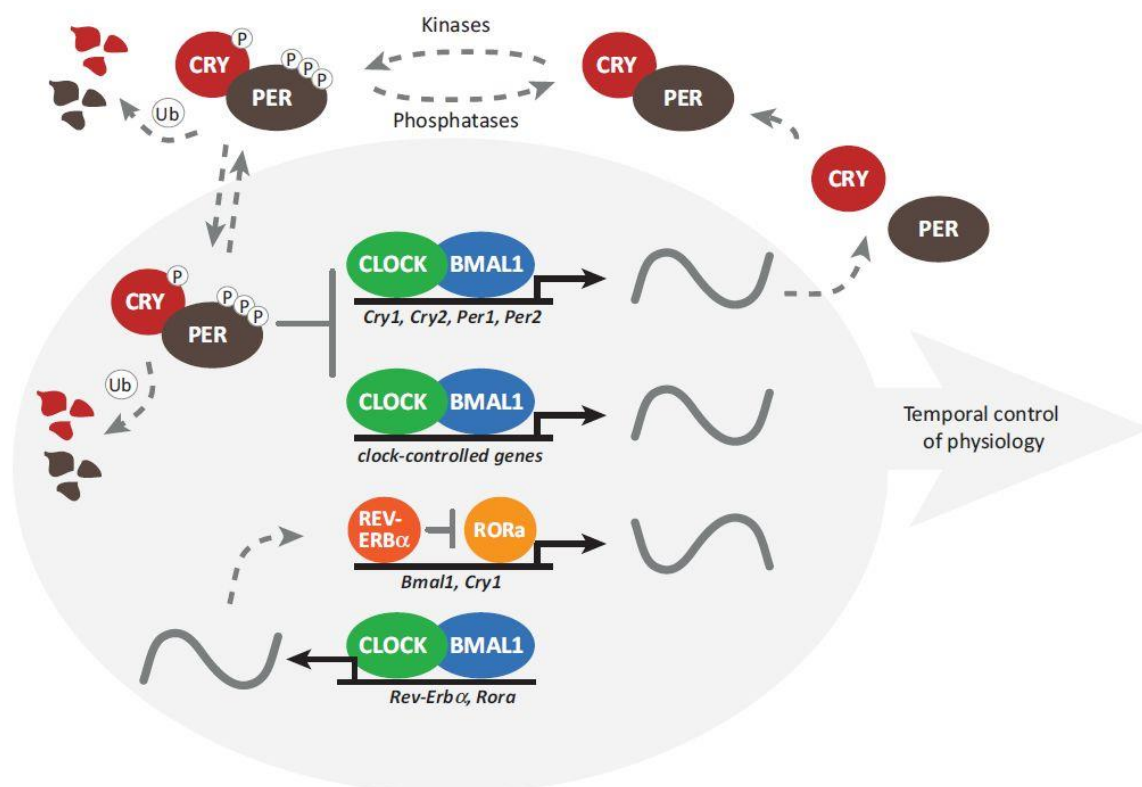
V dnešní době je již jasné, že ačkoli se dílčí komponenty mohou u jednotlivých organismů lišit, hlavní podstatou hodinových systémů jsou u všech živočichů autoregulační transkripčně-translační zpětné smyčky, které obsahují pozitivní i negativní regulační elementy. Tyto smyčky řídí expresi hodinových genů s cirkadiánní periodou.

2.3.1. První zpětnovazebná smyčka a její komponenty

Základ první ze zpětnovazebných smyček tvoří čtyři proteiny. Zaprvé jsou to CLOCK a BMAL1, sloužící jako aktivátory, a zadruhé PER s CRY, zastávající funkci represorů. Samotná smyčka pak funguje na principu, kdy proteiny CLOCK a BMAL1 společně tvoří heterodimery, které se akumulují v jádře buňky. Vzniklý komplex CLOCK:BMAL1 nasedá do oblasti E-boxu, kde je pozitivním regulátorem pro transkripci tří genů *Period* (*per1,2,3*), dvou genů *Cryptochrome* (*cry1,2*) a dále dalších hodinami řízených genů (Gekakis et al., 1998). Proteinovými produkty přepisovaných genů jsou proteiny PER a CRY, které se v cytoplazmě hromadí a tvoří následně dimery, které se v noci vrací zpět do jádra. Tam poté fungují jako blokátory transkripce, protože přímo interagují a s heterodimery CLOCK:BMAL1 a změnou jejich konformace je vyvazují z oblasti E-boxu (Kume et al., 1999). Komplex PER:CRY je poté degradován komplexem E3 ubiquitinligázy, a tak se obnovuje aktivita CLOCK a BMAL1, které opět indukují transkripci (Busino et al., 2007; Reischl et al., 2007) (obr. 3). Celý mechanismus je stabilizován a regulován kinázami (CKI α , CKI δ , and CKI ϵ) a fosfatázami.

Kaseinové kinázy CKI δ a CKI ϵ hrají důležitou roli v určování vnitřní periody hodin kontrolou hladiny dimerů PER:CRY v cytoplazmě. Fosforylace komplexů PER:CRY určuje osud těchto proteinů, které jsou buď degradovány, nebo odeslány do jádra (shrnutí v Ko and Takahashi, 2006).

Většina cirkadiánních oscilátorů používá k aktivaci exprese hodinových genů heterodimery CLOCK:BMAL1 popsané výše, ovšem existují i případy (např. cirkadiánní oscilátory v předním mozku), ve kterých je místo proteinu CLOCK přítomen jeho homolog, neuronální PAS-doménový protein 2 (NPAS2). Stejně jako CLOCK, i NPAS2 může tvořit heterodimer s proteinem BMAL1 a tento komplex může také nasedat na sekvence E-box v promotorech cílových genů (Reick et al., 2001).



Obrázek 3. Transkripčně-translační zpětnovazební smyčky hodinových genů. Synchronizace cirkadiánní rytmicity probíhá s využitím hodinových smyček, které zahrnují čtyři základní hodinové proteiny – dva aktivátory, CLOCK a BMAL1, a dva represory, PER a CRY. Převzato z Partch et al., 2014.

2.3.2. Druhá zpětnovazební smyčka a její komponenty

Druhá zpětnovazební smyčka je generována skrze transkripční aktivaci kyselině retinové příbuzného sirotčího receptoru (*retinoic acid-related orphan receptor*; RORa/b/c) (Sato et al., 2004) a genu pro jaderný receptor REV-ERBα/REV-ERBβ (Raghuram et al., 2007). Komplex BMAL1:CLOCK, vznikající v první smyčce, pozitivně reguluje expresi proteinů REV-ERBα/REV-ERBβ. Následně proteiny RORa/b/c působí jako transkripční aktivátory genu *Bmal1*, jehož transkripci naopak tlumí proteiny REV-ERBα/REV-ERBβ (Guillaumond et al., 2005; Preitner et al., 2002).

Význam druhé hodinové smyčky zahrnující proteiny ROR a REV-ERB byl v současné době podpořen provedením genomové studie srovnávající genový překryv a struktury REV-

ERB obou typů s hlavním cirkadiánním regulátorem BMAL1 (Cho et al., 2012). Duální deplece genu pro proteiny REV-ERB- α a REV-ERB- β u modelu myši vedla k velmi zásadnímu narušení cirkadiánní exprese hlavních genů a změnám v chování myši. Tato studie tedy staví nukleární receptory REV-ERB- α a REV-ERB- β na roveň základním represorům PER a CRY a dalším významným proteinům hodinové smyčky a naznačuje celistvější mechanismus regulace, než bylo dříve předpokládáno (Cho et al., 2012).

2.3.3. Struktura proteinů hodinové smyčky

Moderní metody strukturní krystalografie umožnily lépe porozumět mechanismu vazby proteinových heterodimerů a z ní vyplývajících principů transkripce hodinových genů. Nejprve byla objasněna struktura dimeru CLOCK:BMAL1, která ukázala, že tento důležitý aktivátor patří do rodiny basic helix-loop-helix PER-ARNT-SIM (b-HLH-PAS) proteinů. CLOCK i BMAL1 sdílí podobné strukturní motivy, jimiž interagují při dimerizaci – jednu doménu s motivem b-HLH a další dvě domény s motivem PAS. Všechny tyto tři domény jsou velmi těsně propojeny. Mutace v C-koncových aminokyselinách CLOCK zodpovědných za propojení při dimerizaci provedené v téže studii prokázaly, že specifické struktury konců CLOCK jsou důležité pro udržení stability heterodimeru a zároveň pro zachování jeho správné funkce. V přítomnosti mutovaných heterodimerů CLOCK:BMAL1 totiž docházelo k narušení periodicity cirkadiánního oscilátoru (Huang et al., 2012).

O dva roky později byla s využitím strukturní krystalografie popsána i struktura CRY-vazebné domény dimeru PER2:CRY2 (Nangle et al., 2014). U tohoto dimeru se ukázalo, že je stabilizován intramolekulárním motivem *zinc finger*, jehož integrita je klíčová pro udržení cirkadiánní periody fyziologických rytmů.

2.4. Post-transkripční a post-translační regulace exprese hodinových genů

Z výzkumů posledních let vyplývá, že kromě výše popsaného základního mechanismu regulace exprese hodinových genů zpětnými transkripčně-translačními smyčkami se na regulaci délky cirkadiánní periody i amplitudy rytmu podílí i post-transkripční a post-translační regulace hodinových genů.

Pozorovanou modifikací na post-transkripční úrovni u hodinových genů je alternativní sestřih (McGlinchey et al., 2012). Alternativní sestřih u myši probíhal na úrovni veškerého transkriptu mRNA hodinových a hodinami řízených genů s cirkadiánní rytmitou. Ve stejné studii byla zároveň popsána cirkadiánní rytmita ve změnách hladin některých sestřihových faktorů, které by mohly propojovat mašinerii alternativního sestřihu s cirkadiánním systémem savců.

Mezi nejdůležitější post-translační modifikace probíhající na hodinových genech patří bezpochyby fosforylace. Nejzajímavější výsledky přinesl výzkum mechanismu fosforylace hodinového proteinu PER. Již okolo roku 2000 bylo jasné, že mutace ve vazebném místě proteinu PER pro kaseinovou kinázu 1 ϵ jsou klíčové pro vznik spánkových poruch u člověka, například předčasného probouzení u patologických skřivanů (Toh et al., 2001). Později, v roce 2006, bylo prokázáno, že mutace znemožňující fosforylaci serinu S659 proteinu PER2 vede ke vzniku syndromu dědičného předběhnutí spánkové fáze (Vanselow et al., 2006).

V nové studii odhalili Tamaru et al. (Tamaru et al., 2015) klíčový mechanismus cyklické fosforylace BMAL1 na Serinu90 kaseinovou kinázou 2 α (CK2 α) a následné inaktivace této kinázy kinázou CK2 β . Sledováním proteinových interakcí v čase zjistili, že fosforylaci BMAL1, která je klíčová pro zachování cirkadiánní rytmicity, inhibuje protein CRY. Tato studie tedy naznačuje duální funkci proteinu CRY nejen jako inhibitoru transkripce BMAL1 a CLOCK, ale také jako inhibitoru vazby CK2 α na protein BMAL1 a následné klíčové fosforylace.

Překvapivým objevem na úrovni post-translačních modifikací byla publikace popisující *Clock*^{-/-} myš, jejíž cirkadiánní rytmus se téměř neliší od kontrolních myší (Collins and Blau, 2006). Tato publikace zpochybnila vnímání genu *Clock* jako klíčového hráče v udržování rytmicity. K vysvětlení tohoto jevu velmi významně přispělo objevení histonacetyltransferázové funkce CLOCK proteinu, který acetyluje histony H3 a H4, a slouží tak jako aktivátor transkripce hodinových genů i v případě, že je mutací znemožněna tvorba heterodimeru CLOCK:BMAL1. (Doi et al., 2006). Navíc autoři publikace uvádějí, že histonacetyltransferázová aktivita CLOCK proteinu je ještě zesílena jeho partnerem BMAL1.

V játrech myši bylo nalezeno přes 30 genů, které si zachovaly cirkadiánní rytmitu exprese i při lokálním specifickém odstranění jaterních cirkadiánních hodin. Produkty těchto genů hrají pravděpodobně důležitou roli v post-translační kontrole tkáňově specifické exprese cirkadiánních genů. Jsou to proteiny FUS (fused in sarcoma), CIRBP (cold-inducible RNA-binding protein) a Nocturnin (Kornmann et al., 2007). Nocturnin nepatří k hlavním hodinovým genům, ale je to hodinově řízená deadenyláza, která kromě předpokládané post-translační funkce ovlivňuje také polyadenylaci mRNA v tenkém střevě (Wang et al., 2001). Výzkum post-transkripčních modifikací hodinových genů Nocturninem je velmi aktuální i díky možnému propojení s potravním metabolismem a vznikem obezity (Douris et al., 2011).

3. Sítňice

Sítňice je smyslový orgán oka, který zajišťuje zachycení fotonu a transdukcii jeho energie do prvního nervového signálu putujícího k dalšímu zpracování do mozku. Než však fotony dosáhnou sítňice, musí projít skrz slzný film, rohovku, přední komoru, čočku, zadní komoru a sklivce (Morin and Allen, 2006). Gangliové buňky sítňice vytváří svými axony optický nerv, který vede informace jednak do zrakových center CNS zodpovědných za utváření viděného obrazu, a jednak do SCN a jiných hypotalamických oblastí či oblastí limbického systému, kde ovlivňují řadu fyziologických a behaviorálních procesů (LeGates et al., 2014).

3.1. Stavba sítňice

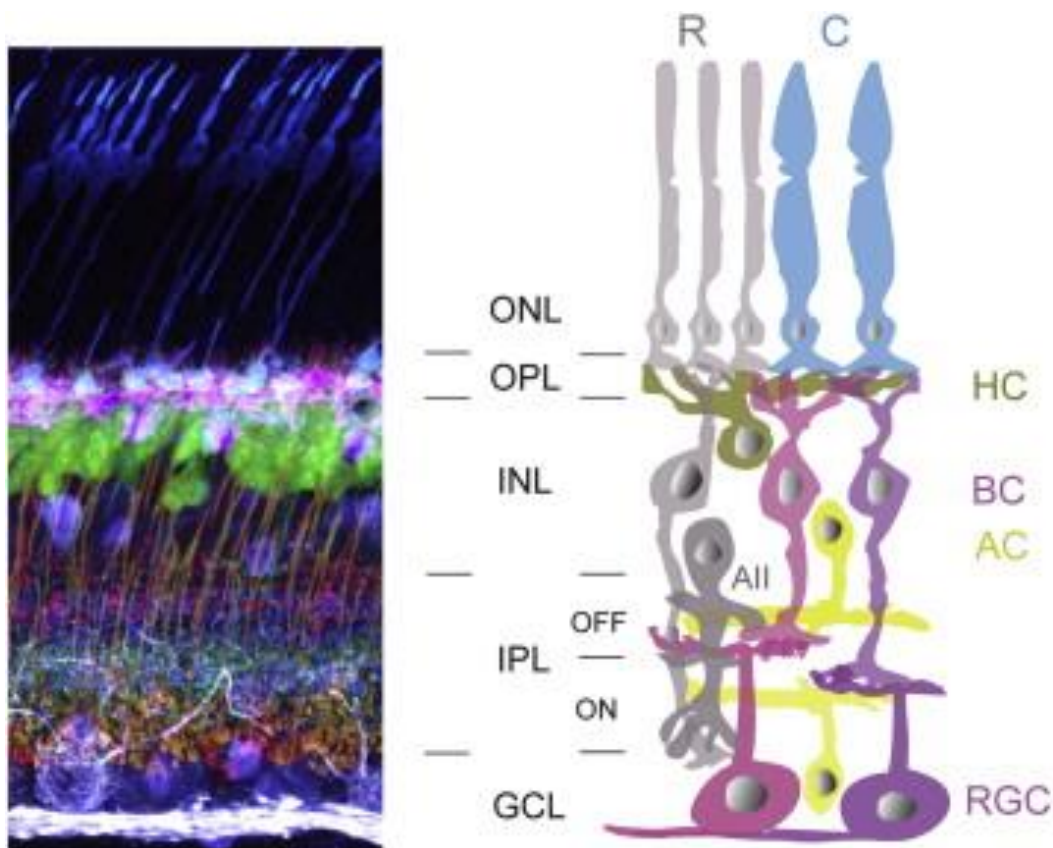
Světlo dopadající na sítňici je převedeno fotoreceptory na elektrochemický signál, který je veden neurony až do korových vrstev CNS. Než však světlo dopadne na tyčinky a čípky, musí projít transparentní vrstvou sítňice složenou z nervových vláken, gangliových, amakrinních a bipolárních buněk. Retinální pigmentový epitel (RPE) je nejbližší přilehlou vrstvou k fotoreceptorům, která jim zajišťuje strukturální i metabolickou podporu (Wassle and Boycott, 1991), především metabolismus nezbytného vitamínu A (Wald, 1933).

Napříč celým podkmenem obratlovců můžeme nalézt konzervovaný základní plán stavby sítňice, pět hlavních tříd neuronů, podporovaných Müllerovými gliovými buňkami. Proces zpracování vizuální informace začíná transdukcí energie fotonů na membránový potenciál fotoreceptory, který je veden jako signál pomocí neurotransmiterů dále k dalším neuronům až do korových oblastí mozku (Wassle and Boycott, 1991).

Zevní jadernou vrstvu (ONL) sítňice tvoří těla fotoreceptorových buněk. Síla vrstvy je téměř stejná jak v centrálním, tak i v periferním regionu sítňice. Následuje vnější vrstva plexiformní (OPL), utvářená synapsemi fotoreceptorů, bipolárních buněk (BC) a buněk horizontálních (HC) (obr. 4).

3.1.1. Fotoreceptory

Fotoreceptory dělíme do dvou skupin, na tzv. tyčinky (z angl. *rod* – R) a čípky (z angl. *cone* – C). Tyčinky, které v sítňici počtem výrazně převažují, zajišťují vidění při nízké intenzitě světla, až na úrovni jednoho fotonu (Sampath and Rieke, 2004). Fotopigmentem tyčinek je rhodopsin s vrcholem citlivosti (λ_{\max}) přibližně 500 nm. Receptory pro barevné vidění jsou čípky, které jsou až 100krát méně citlivé na intenzitu světla než tyčinky. Dále se čípky liší pigmentem, kterým je opsin, jenž je specificky citlivý k vlnovým délkám světelného spektra.



Obrázek 4. Vrstvy neuronů v savčí sítnici. Levá část: Vertikální řez myší sítnicí představuje hlavní typy neuronů. ONL – vnější jaderná vrstva, OPL – vnější plexiformní vrstva, INL – vnitřní jaderná vrstva, IPL – vnitřní plexiformní vrstva, GCL – vrstva gangliových buněk. Pravá část: Schematický nákres retiny. R – tyčinky, C – čípky, HC – horizontální buňka, BC – bipolární buňka, AC – amakrinní buňka, RGC – gangliová buňka. Převzato z Hoon et al., 2014.

Šíře vnímaných barev je napříč třídou savců různá. Například lidská sítnice disponuje třemi typy čípků – *modré* pro krátké vlny s $\lambda_{\max} = \sim 425$ nm (označované S, short-wave), *zelené* pro střední vlny s $\lambda_{\max} = \sim 530$ nm (M, middle-wave), a *červené* pro vlny dlouhé s $\lambda_{\max} = \sim 560$ nm (long-wave, LW) (Kochendoerfer et al., 1999; Nathans, 1999). Sítnici hlodavců však tvoří pouze dva typy čípků, zelené, M ($\lambda_{\max} = \sim 510$ nm), a modré, S ($\lambda_{\max} = \sim 360$ nm) (Foster, 1998; Jacobs, 1993).

Výzkumy prokázaly, že rozmístění čípků na sítnici není pravidelné. Dorzální polovina myší sítnice je obsazena především zelenými čípkami, zatímco ventrální oblasti dominují čípkami modré (Calderone and Jacobs, 1995; Szél et al., 1992).

3.1.2. Objev nových fotoreceptorů a nového opsinu

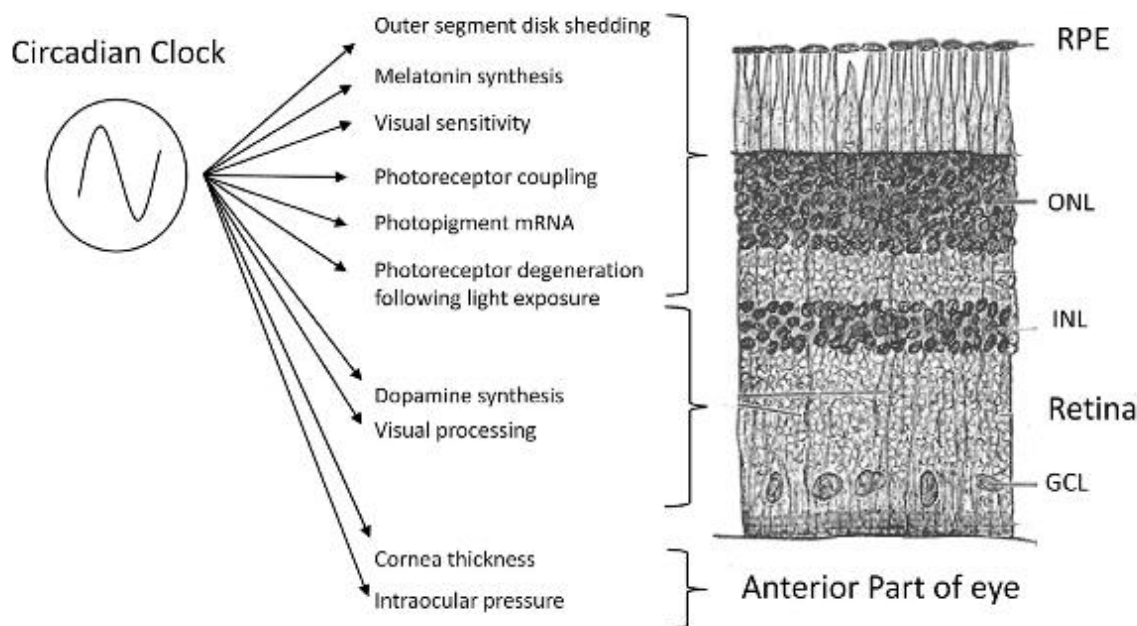
Přestože se vědci po desetiletí domnívali, že za vnímání světla jsou zodpovědné pouze tyčinky a čípky, na přelomu tisíciletí se začaly objevovat ve vědecké literatuře články

předvídající existenci dalšího typu fotoreceptorů v retině. Jedním z příkladů bylo prokázání významného snížení syntézy neurohormonu melatoninu u slepců bez funkčních tyčinek a čípků po osvětlení v noci (Lockley et al., 1997). Jestliže bylo toto snížení indukováno světlem i u lidí bez funkčních tyčinek a čípků, bylo zjevné, že existuje ještě jiný typ fotoreceptoru, nezávislý na fotoreceptorech důležitých pro obrazové vidění. Další důkazy přinesly pokusy na transgenních myších bez tyčinek a čípků, u kterých přesto docházelo k odpovědím cirkadiálního systému na fázové posuny v cyklu střídání světla a tmy (Freedman et al., 1999), a k pupilárnímu reflexu při světelném podnětu (Lucas et al., 2001). Buňky zodpovědné za transdukcii fotonů v nepřítomnosti tyčinek a čípků byly nakonec identifikovány jako podskupina gangliových buněk sítnice (Provencio et al., 2002). V těchto buňkách byl objeven nový typ opsinu, melanopsin, s genovou strukturou poněkud odlišnou od do té doby známých lidských opsinů (Provencio et al., 2000). Tyto buňky byly nazvány fotosenzitivními retinálními gangliovými buňkami (z angl. *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*, ipRGC) a byl prokázán přenos informace o světelném signálu těmito buňkami do SCN (Berson et al., 2002). Zdá se tedy, že tyto buňky jsou zodpovědné za nastavování fáze cirkadiálních hodin v závislosti na cyklu vnějšího střídání světla a tmy a jsou primárními fotoreceptory cirkadiálního systému. Do dnešní doby již byly identifikovány různé typy těchto buněk s odlišnostmi ve struktuře i funkci (shrnutí v (Sanes and Masland, 2015).

4. Cirkadiální systém v sítnici

Cirkadiální systém v savčí retině je zodpovědný za kontrolu několika funkcí. Mezi silně rytmické pochody v retině patří např. změny hladin fotopigmentů a neuromodulátorů, fagocytóza vnějších segmentů fotoreceptorů nebo zraková citlivost (obr. 5). Všechny tyto pochody zachovávají cirkadiální rytmicitu i při konstantní tmě, takže jsou s největší pravděpodobností řízeny autonomním cirkadiálním oscilátorem v retině (Guido et al., 2010).

V roce 1996 podali Tosini a Menaker důkaz, že v retině je autonomní oscilátor nezávislý na SCN. Ve své studii popsali rytmickou syntézu melatoninu v sítnici u křečků a zjistili, že světlo nepřímo potlačuje syntézu melatoninu. Sítnice křečků kultivované *in vitro* při teplotě 27°C vykazovaly po umístění do konstantní tmy přetrvávající cirkadiální rytmus v syntéze melatoninu po dobu delší než pět dní. Navíc pokud byla srovnána syntéza melatoninu v sítnicích kultivovaných při světelném cyklu posunutém o sedm hodin vpřed a v cyklu o sedm hodin opožděném, ukázalo se, že tyto dva druhy sítnic vykazují nejvyšší hladiny melatoninu v přesně opačných časech (Tosini and Menaker, 1996).



Obrázek 5. Lokalizace procesů ve vrstvách sítnice. Na obrázku je zobrazeno několik doposud objasněných cirkadiánních procesů probíhajících v retině a v oku, společně s jejich pravděpodobnou lokalizací podle vrstev sítnice. RPE – retinální pigmentový epitel, ONL – zevní jaderná vrstva, INL – vnitřní jaderná vrstva, GCL – vrstva gangliových buněk. Převzato z McMahon et al., 2014.

První studie sice prokázaly, že exprese hodinových genů v retině probíhá s cirkadiánní rytmitou, ovšem neukazovaly, v jakých konkrétních buňkách exprese probíhá a zda se nějak liší od mechanismu exprese hodinových genů v SCN. Další výzkum tedy směřoval k identifikaci konkrétních buněk, ve kterých probíhá exprese hodinových genů. Výsledky těchto studií byly dlouho nekonzistentní a prokazovaly přítomnost cirkadiánních rytmů v expresi genů v různých buněčných typech. U potkanů chovaných v režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy (LD12:12) prokázali Namihira et al. (2001) cirkadiánní expresi genu *rPer2*, s nejvyšší hladinou transkriptu v čase ZT14, tj. dvě hodiny po zhasnutí. Na rozdíl od *rPer2*, hladiny transkriptu *rPer1* byly po celý cyklus konstantní.

Tato studie také prokázala, že hladiny mRNA transkriptu *rPer1* jsou nízké ve fotoreceptorech a vyšší ve vnitřní jaderné vrstvě sítnice. Nízkou hladinu *Per1* mRNA ve fotoreceptorech potvrdily i studie následující v dalších letech, používající novější metodiky (Tosini et al., 2007).

Müllerovy buňky jsou hlavními gliovými buňkami retiny a jsou odpovědné za propojení fyziologických funkcí v retině. V nedávné studii (Xu et al., 2016) byla pozorována exprese hodinových genů v těchto buňkách u člověka a u myši. Ukázalo se, že u obou druhů jsou v Müllerových buňkách exprimovány všechny hodinové geny a že jejich exprese probíhá s cirkadiánní periodou. Při pozorování izolovaných myších Müllerových buněk, značených

bioluminiscentním reportérovým genem PERIOD 2::LUCIFERASE (PER2::LUC), byla u exprese reportérového hodinového genu prokázána robustní cirkadiánní rytmicita přetrvávající po několik dní po zahájení sledování. Překvapivým objevem ale je, že u člověka, na rozdíl od myši, pravděpodobně nezávisí rytmicita exprese hodinových genů v Müllerových buňkách na expresi genu *Per1*, což se ukázalo při knockdownu *Per1* pomocí siRNA (Xu et al., 2016).

Velmi rozsáhlá studie s významnými výsledky, předesílajícími nežádoucí dopady nočního světla na organismus savců, byla provedena v roce 2013 (Bobu et al., 2013). Myš *Arvicanthis ansorgei* s velkým množstvím čípků byla adaptována k režimu LD12:12. Poté byla analyzována exprese hodinových genů u tří skupin zvířat – jedné kontrolní skupiny, u které nebyl světelný režim změněn, u jedné skupiny, která byla před odebráním vzorků vystavena 36 hodin trvající tmě, a skupiny, vystavené před odebráním vzorků 36 hodin trvajícímu stálému světlu. Poté byla zvířata každé tři nebo čtyři hodiny zabíjena, byly jim odebrány vzorky retiny a z nich extrahována RNA. Na základě navržených oligonukleotidových primerů pro hodinové geny *Arvicanthis* byla provedena real-time PCR. Ukázalo se, že exprese všech hodinových genů byla v kontrolních vzorcích beze změn ve světelném režimu zcela rytmická a synchronizovaná u většiny genů s maximem těsně po rozsvícení světla (ZT 0). Exprese enzymu účastnícího se syntézy melatoninu, arylalkylamin N-acetyltransferázy (AANAT), byla nejvyšší v ZT 20. U myši s režimem konstantní tmy byly profily exprese obdobné, ovšem u většiny nedosahovaly ani zdaleka hladin exprese u kontrolních vzorků a u některých (např. melanopsinu) nebyla vůbec přítomna rytmicita exprese. U vzorků vystavených konstantnímu světlu byly profily exprese všech hodinových genů velmi značně změněny – buď se jednalo o profily exprese s chybějící denní rytmitou, nebo s fázovým předběhnutím nejvyšší hladiny exprese o 4–10 hodin. Tato data jako jedna z prvních dokazují velmi silné negativní dopady nepatřičného, tj. nočního, světla u savců s denní aktivitou na regulaci exprese hodinových a fotoreceptorových genů (Bobu et al., 2013).

4.1. Ovlivnění SCN autonomními retinálními cirkadiánními hodinami

Bylo naznačeno, že v nepřítomnosti light dark (LD) cyklu řídí retinální cirkadiánní systém skrze retinohypotalamický trakt i centrální hodiny v SCN. Vnitřní hodinový systém retiny může ovlivňovat i SCN narušením rytmu v MAPK-kaskádě (Lee et al., 2003) nebo změnami hladin proteinu CREB, na němž je závislá syntéza hodinových genů v SCN (Álvarez-López et al., 2004).

4.2. Syntéza neuromodulátorů v retině

Melatonin a dopamin jsou neurohormony, které velmi významně ovlivňují fyziologii a patofyziologii retiny. V dnešní době je mechanismus těchto pochodů již poměrně dobře popsán, především díky výzkumům transgenních zvířecích modelů s narušeným melatoninerním nebo dopaminerním systémem.

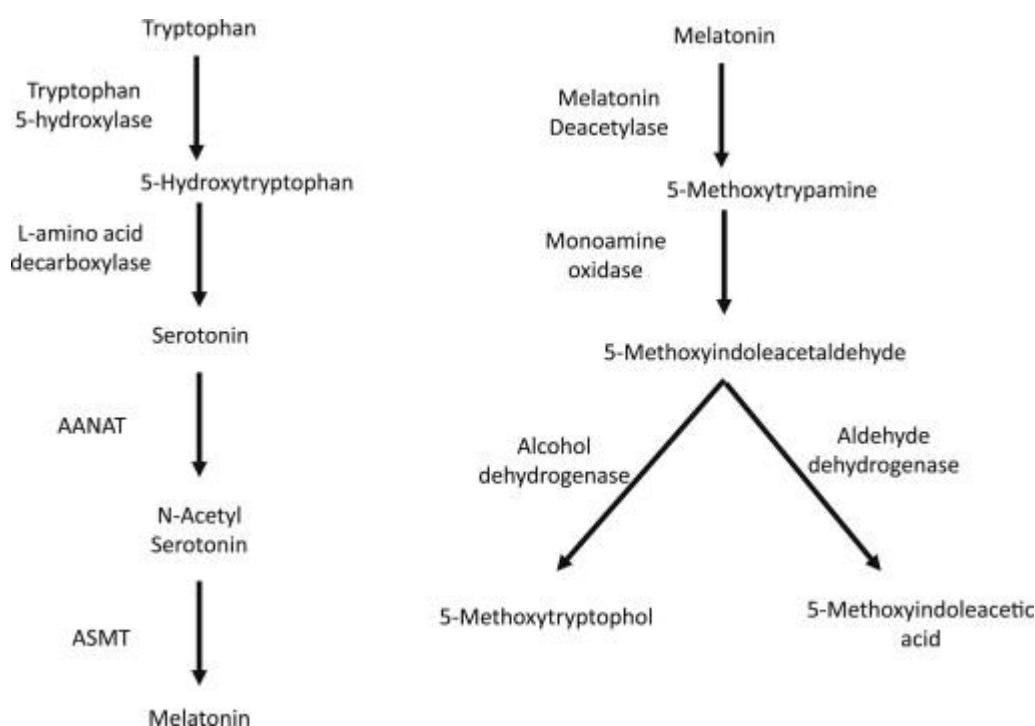
4.2.1. Melatonin

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamin) je neurohormon syntetizovaný zejména v epifýze a v retinálních buňkách. Melatonin je syntetizován z aminokyseliny tryptofanu (Trp) čtyřstupňovou biochemickou reakcí. Ta nejprve zahrnuje konverzi na 5-hydroxytryptofan pomocí tryptofan hydroxylázy, poté pokračuje přeměnou 5-hydroxytryptofanu na 5-hydroxyamin (neboli serotonin) a dále enzymem na aromatickou-L-amino kyselinovou dekarboxylázou (AAAD). Syntéza melatoninu ze serotoninu je poté dokončena ve dvou dalších reakcích – zaprvé klíčovou reakcí ovlivňující rytmickou syntézu melatoninu, kdy enzym akrylamin-N-acetyltransferasy (AANAT) přeměňuje serotonin na N-acetylserotonin, a zadruhé finální reakcí katalyzovanou N-acetylserotonin-O-methyltransferázou. Degradace melatoninu probíhá jednoduchou dráhou v játrech, blíže popsanou na obrázku 6 (Iuvone et al., 2005).

Syntéza melatoninu v epifýze podléhá regulaci z SCN a její rytmus je způsoben změnami v transkripční a post-transkripční regulaci exprese AANAT (Iuvone et al., 2005). Již v roce 2000 bylo objeveno, že syntéza melatoninu v sítnici zůstává rytmická i u zvířat s lézí SCN a že tato cirkadiánní syntéza je řízena autonomním oscilátorem v retině (Sakamoto et al., 2000).

Transkripce genu *Aanat* ve fotoreceptorových buňkách spadá pod přímou kontrolu cirkadiánních hodin, jelikož obdobně jako hodinové geny *Per* a *Cry* obsahuje v promotoru E-box, jenž je přepisován pouze za přítomnosti heterodimerů BMAL1:CLOCK (Chen and Baler, 2000).

Expresí genu *Aanat* je ovšem regulována i post-translačně, a to pomocí fosforylace. Jak zjistili Pozdeyev et al. (2006), během noci (za nepřítomnosti světla) je retinální enzym AANAT fosforylován a formuje komplex s 14-3-3 proteiny. 14-3-3 proteiny v tomto komplexu slouží jako stabilizátory a aktivátory AANAT a umožňují tak účinnější a rychlejší syntézu melatoninu v nočních hodinách. Za přístupu světla je AANAT defosforylována a degradována (Pozdeyev et al., 2006).



Obrázek 6. Syntéza a degradace melatoninu. Převzato z Tosini et al., 2012.

Zatímco melatonin z epifýzy působí jako endokrinní hormon, retinální melatonin působí lokálně jako parakrinní neuromodulátor. Správné načasování syntézy melatoninu je důležité pro správné fungování fyziologických funkcí retiny a v případě narušení jeho syntézy dochází ke vzniku patologických stavů retiny. Melatonin je syntetizován ve fotoreceptorových buňkách, přičemž v nočních hodinách je hladina syntetizovaného melatoninu násobně vyšší než v denních hodinách. Společně s druhým neurohormonem dopaminem tak umožňují změny v retině za nočního a denního režimu.

Že je melatonin klíčovým hráčem v ovlivňování retinální fyziologie, bylo popsáno již v roce 1988 (Wiechmann et al., 1988). Melatonin působí skrze vazbu na receptory spřažené s G-proteiny, pojmenované melatoninový receptor 1. typu (MT1) a melatoninový receptor 2. typu (MT2). Oba typy těchto receptorů jsou přítomny v retině obratlovců.

V nedávném výzkumu sledovali Hiragaki et al. (2014) pomocí laserové mikrodisekce denní a cirkadiánní rytmicity exprese genů *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Dbp*, *Nampt* a *c-fos* ve fotoreceptorech retiny u myši s genetickou delecí melatoninových receptorů MT1 a MT2. Ukázalo se, že cirkadiánní rytmicity exprese hodinových a hodinami řízených genů v retině jako celku je velmi silně zasažena odstraněním melatoninové signalizace, zatímco ve fotoreceptorové vrstvě je narušena pouze cirkadiánní rytmicity exprese genu *Bmal1*. Tento

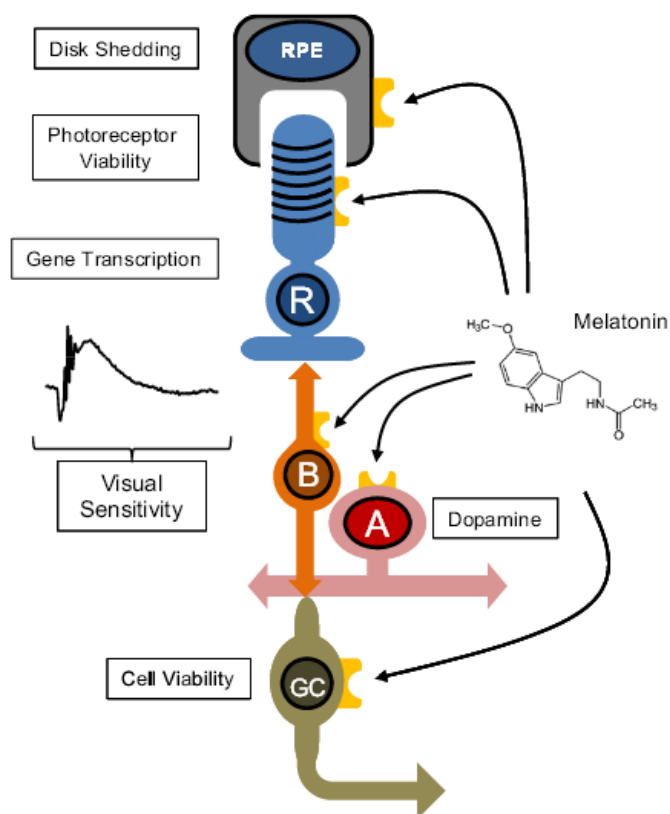
výzkum tedy naznačuje, že melatonin je zcela zásadní pro funkčnost cirkadiánních hodin ve vnitřní jaderné nebo gangliové vrstvě buněk, ale nikoli ve vrstvě fotoreceptorů.

Vnější segmenty tyčinek (z angl. *rod outer segments* – ROS) jsou neustále obnovovány spojováním nových membránových disků na bázi ROS a jejich posunem a postupnou výměnou za staré disky. Staré disky jsou vysouvány z apikální části ROS a fagocytovány RPE. Tyto dva procesy jsou řízeny cirkadiánním systémem a fungují s pravidelností 24 hodin. Tento proces je známý jako fagocytóza vnějších segmentů fotoreceptorů (*disc shedding*) (LaVail, 1980).

Některé velmi rané studie předesílaly propojení fagocytózy vnějších segmentů fotoreceptorů melatoninovou signalizací (Besharse and Dunis, 1983), ovšem dalšímu ověřování platnosti této hypotézy (a také jejímu rozšíření na savčí modelové organismy oproti tehdy využívanému *Xenopus*) se ve vědecké literatuře dostala pozornost až v současné době. V roce 2013 bylo prostřednictvím sledování transgenních myší bez funkčních MT1 nebo MT2 receptorů prokázáno, že melatonin skrze MT receptory skutečně ovlivňuje disc shedding (Tosini et al., 2013) a další retinální funkce (obr. 7). Fagocytóza disků u MT1 nebo MT2 KO myší byla o tři hodiny předběhnuta a tato změna značně ovlivnila zdravotní stav retiny zvířat. MT1 a MT2 KO myši totiž vykazovaly signifikantní nárůst kumulace lupofuscinu v RPE a značné snížení počtu fotoreceptorových buněk (Tosini et al., 2013).

4.2.2. Dopamin

Dopamin (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) je klíčový neurotransmitter syntetizovaný ve specifických neuronech v různých regionech mozku a v dopaminergních amakrinních buňkách retiny. Obdobně jako melatonin je v retině dopamin syntetizován s cirkadiánní rytmitou, ovšem na rozdíl od melatoninu jsou jeho hladiny významně vyšší během dne a zároveň jeho syntéza stoupá v reakci na světelný signál. Dopamin působí skrze receptory spřažené s G proteiny, které jsou v jeho případě pěti typů (D1 – D5) a rozdělují se do dvou specifických rodin D1 a D2. Mezi receptory D1 rodiny patří typy D1 a D5, které jsou pozitivně spřaženy s adenylátcyklázou (jejich aktivací se zvyšuje intracelulární koncentrace cAMP), a mezi receptory D2 rodiny patří typy D2, D3 a D4, které jsou negativně spřaženy s adenylátcyklázou (jejich aktivace snižuje intracelulární hladiny cAMP) (Witkovsky, 2004).



Obrázek 7. Vliv melatoninu na retinální funkci. Melatoninové receptory jsou exprimovány v mnoha retinálních buněčných typech, především ovšem ve fotoreceptorech. Aktivace těchto receptorů ovlivňuje některé retinální funkce, jako např.: disc shedding, životnost retinálních buněk, optickou citlivost nebo hladiny dopaminu či metabolismus. RPE – retinální pigmentový epitel, R – tyčinky, B – bipolární buňky, A – amakrinní buňky, GC – gangliové buňky. Převzato z Tosini et al., 2012.

V ovlivňování cirkadiánní rytmicity v retině je dopamin klíčovým neuromodulátorem především díky své funkci při synchronizaci cirkadiánních hodin světlem. První objev této funkce se datuje do počátku 90. let, kdy se ukázalo, že pokud je zablokována dopaminergní transmise skrze D2 receptory, jsou blokovány také fázové posuny cirkadiánního rytmu, způsobené světelným impulsem s následnou narušenou sekrecí melatoninu (Cahill and Besharse, 1991).

V roce 2008 publikovali Ruan et al. model vnitřního retinálního cirkadiánního systému myši, regulovaného dopaminem a GABA (obr. 8). Na základě pozorování dlouhodobé kultury intaktních myších retin značených luminiscentním reportérovým hodinovým genem PER2::LUC popsali rytmické luminiscenční signály koncentrované v INL. Narušení buněčné komunikace skrze hlavní neurotransmiterový systém fotoreceptorů a gangliových buněk nezměnilo retinální cirkadiánní PER2::LUC rytmy. Autoři předpokládají, že dopamin působící prostřednictvím D1 receptorů nastavuje správné časování oscilace, a GABA,

působící prostřednictvím membránové hyperpolarizace, je zodpovědná za amplitudu PER2::LUC luminiscence (Ruan et al., 2008).

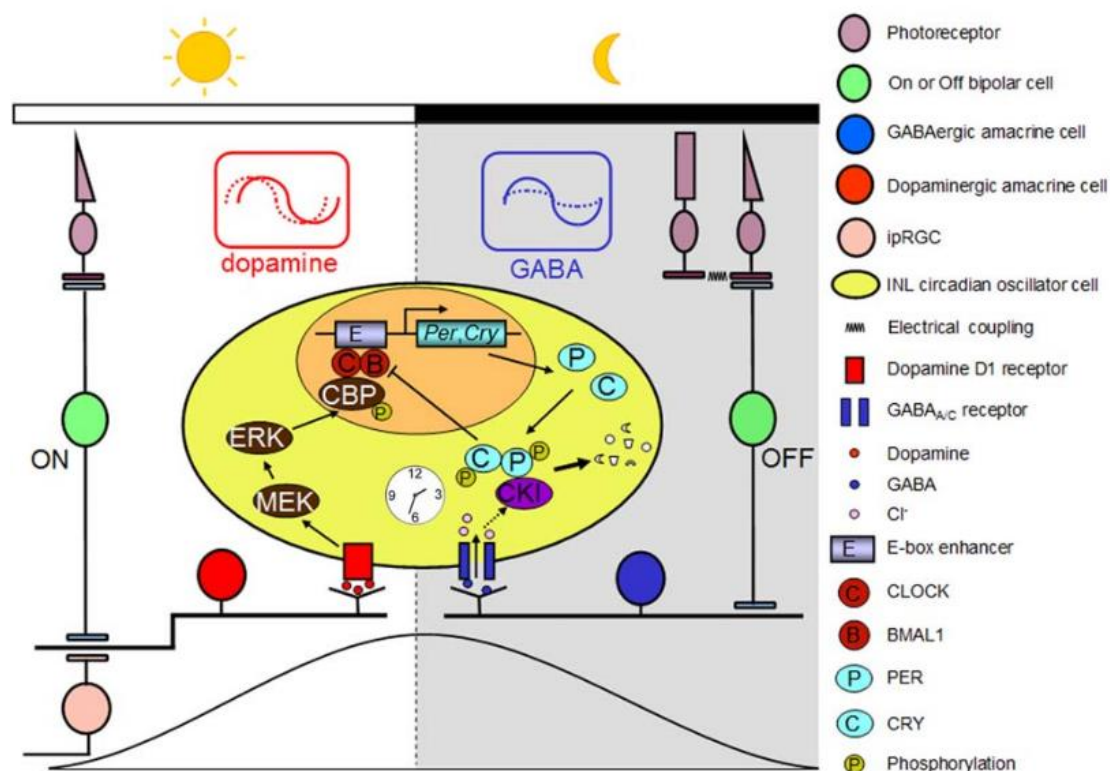
V roce 2012 publikovali Jackson et al. (2012) studii provedenou na modelu myši se specifickou retinální dopaminovou deficiencí (syntéza dopaminu v mozku zůstala zachována). Tento model ukázal deficity v odpovědích na elektroretinografu, které záležely na přijímání světelných impulsů, citlivosti a přesnosti kontrastního vnímání a retinálních cirkadiánních rytmech. Některé z těchto deficitů byly obdobné i u D1 nebo D4 receptoru KO myši a mohly být vráceny zpět do normálu podáním specifických agonistů D1 nebo D4 receptorů. Tyto výsledky naznačují významnou roli dopaminu (a také jeho receptorů typu D1 a D4), syntetizovaného v retině v nastavení rozlišení a kontrastu zraku (Jackson et al., 2012).

4.2.3. GABA

GABA (γ -Aminobutyrová kyselina) je hlavní inhibiční neurotransmitter v retině obratlovců. Je syntetizována GABAergními amakrinními buňkami ve vnitřní retinální vrstvě s cirkadiánní aktivitou a vyšší syntetickou aktivitou v nočních hodinách. Zatímco starší studie lokalizovaly syntézu GABA i do všech dopaminergních amakrinních buněk, tuto možnost s využitím sledování enzymů účastnících se syntézy GABA pomocí konfokální mikroskopie byla vyloučena (Quan, 2016). Receptory pro GABA jsou dvou typů: GABA(A) receptory, což jsou ionotropní chloridové iontové kanály, a GABA(B) receptory, což jsou metabotropní receptory spřažené s G-proteiny. GABA(A) receptory ovlivňují citlivost retinálních cirkadiánních rytmů k přítomnosti světla (Maggiore and Ralph, 1999), ovšem konkrétní mechanismus zatím nebyl popsán.

Na rozdíl od melatoninu a dopaminu, u nichž je výzkum vlivu na cirkadiánní rytmy v retině již velmi pokročilý, studií věnujících se cirkadiánně řízené syntéze GABA v retině zatím mnoho není.

Jedna ze studií, která se zabývala vlivem závislosti syntézy GABA v retinálních buňkách na cirkadiánním systému, měřila míru fluktuace, specifické vazby a uvolňování GABA u zlatých křečků v konstantní temnotě. Výsledky této studie ukázaly významné změny v koncentraci GABA opakující se s 24hodinovou pravidelností i v konstantní tmě. Tyto výsledky naznačují možnost řízení syntézy GABA cirkadiánními hodinami, ovšem nevylučují zcela ani možnost, že je GABAergní aktivita částečně ovlivněna přítomností či nepřítomností světla (Jaliffa et al., 2001).



Obrázek 8. Model organizace cirkadiánních hodin v sítnici myši. Dopaminergní amakrinní buňky (červeně) a GABAergní buňky (modře) posilují autonomně generované stavy „den“ a „noc“ u buněk oscilátoru v INL (žlutě) prostřednictvím rytmické sekrece dopaminu a GABA. Transmise dopaminu, stimulovaná informací o světelném impulsu, přicházející z čípků před zapnuté (ON) bipolární buňky a/nebo ipRGC synchronizuje retinální cirkadiánní oscilátor a nastavuje fázi „den“. V noci pak excitační vstup z vypnutých (OFF) bipolárních buněk zahajuje aktivitu GABA, která skrze GABA(A) a GABA(C) receptory potlačuje expresi *Per* a spouští degradaci akumulovaného PER proteinu, čímž resetuje efekty dopaminu. Převzato z Ruan et al., 2008.

V další ze studií, provedené taktéž na křečcích, studovali vědci souvislost hladin GABA s hladinami melatoninu. Prokázali, že GABA signifikantně zvýšila hladiny melatoninu a tento efekt mohl být zablokovan antagonisty GABA(A) receptorů, zatímco antagonisty GABA(B) receptorů nikoli. Hladina GABA byla v této studii signifikantně vyšší v noci než ve dne a ovlivňovala také koncentraci cAMP (jehož koncentraci znatelně snižovala) a cGMP (jehož koncentraci zvyšovala). Z těchto výsledků se zdá, že je GABA ve velmi úzkém spojení s melatoninem a společně umožňují fungování retiny za tmy (Jaliffa et al., 1999).

4.3. Vliv cirkadiánních hodin v retině na zrakové funkce

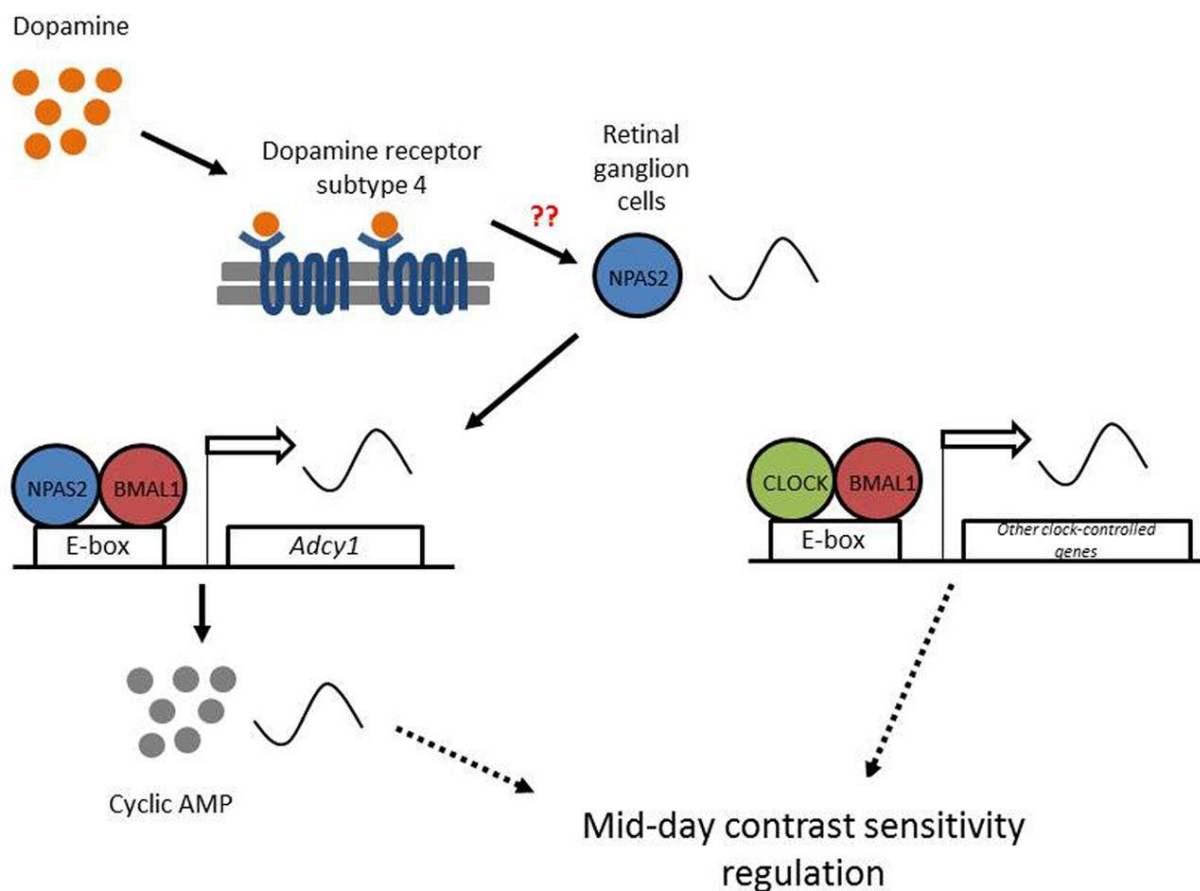
Kromě ovlivňování retinálních pochodů na buněčné a molekulární úrovni hrají retinální cirkadiánní hodiny roli i v mnohem širších a komplexnějších jevech zahrnujících zrakové funkce. Nejvýznamnějším příkladem ovlivnění zrakových funkcí autonomním cirkadiánním oscilátorem v retině je střídání fotopického (zprostředkovaného čípkou) a skotopického (zprostředkovaného tyčinkami) vidění ve dne a v noci. Extrémním případem tohoto, na cirkadiánním rytmu závislého, střídání jsou dokonce měnící se délky útvarů nalézáných v synaptických zakončeních fotoreceptorů sítnice (tzv. *synaptic ribbons*). Tyto útvary byly

pozorovány nejprve u nesavčích organismů, u kterých dochází v noci dokonce k takovému zkrácení synaptic ribbons, že je úplně znemožněna neurotransmise zprostředkovaná čípky (Emran et al., 2010). U savců je zatím výzkum těchto útvarů teprve v počátku, ovšem již nyní některé studie prokázaly cirkadiánně řízenou změnu v jejich délce, která vedla ke změnám zrakové citlivosti v průběhu dne a noci (Balkema et al., 2001).

Výzkumem souvislosti cirkadiánní rytmicity a vizuální senzitivity se na přelomu tisíciletí zabývali Tassi et al. (1997). Na základě vlastních dřívějších poznatků o změnách vizuální citlivosti u zvířat v čase provedli experiment, ve kterém byla měřena zraková citlivost sedmi lidí na základě dvou metod stanovujících práh citlivosti zrakového vnímání. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že práh detekce byl u čtyř ze sedmi subjektů významně zvýšen v ranních hodinách, a předeslaly tak možnost proměnlivosti vizuální citlivosti v závislosti na cirkadiánním rytmu i u lidí. Vzhledem k použité metodice studie není bohužel jasné, zda je za tyto výsledky odpovědný centrální oscilátor v suprachiasmatických jádrech nebo retinální cirkadiánní oscilátor.

Nedávno byl v literatuře popsán mechanismus vlivu cirkadiánních hodin v retině na kontrastní citlivost (Hwang et al., 2013). Kontrastní citlivost je jednou ze základních zrakových funkcí a ukázalo se, že podléhá cirkadiánní rytmitě, a to s nejvyšší přesností během dne. Základním krokem mechanismu regulace kontrastní citlivosti je aktivace D4 receptorů v retinální gangliové vrstvě buněk, o níž bylo již dříve známo, že reguluje hladinu exprese genu *Adcy1*, a tím i hladinu cAMP v gangliových buňkách (Jackson et al., 2011). Nový výzkum ale ukázal, že pro rytmickou expresi *Adcy1* je nutná přítomnost proteinu NPAS2 (nestačí ani přítomnost jeho homologu CLOCK) a aktivace D4 receptorů musí tudíž zatím neobjasněným mechanismem zahájit rytmickou transkripci genu *Npas2* (obr. 9).

Cílené narušení genu kódujícího D4 receptory zmenšilo amplitudu kontrastní citlivosti snížením denního maxima. Zároveň toto snížení zcela odstranilo rytmitu v expresi *Npas2* a *Adcy1* mRNA v retinální gangliové vrstvě buněk. Mechanismus, kterým cAMP v retinálních gangliových buňkách reguluje kontrastní citlivost, nebyl dosud objasněn, ale podle nejnovějších teorií by mohl zahrnovat regulaci kanálů řízených hyperpolarizací aktivovaných cyklických nukleotidů (Stradleigh et al., 2011) nebo regulaci gap junctions (Mills et al., 2007).



Obrázek 9. Model regulace kontrastní citlivosti. Dopamin prostřednictvím D4 receptorů reguluje rytmickou expresi *Npas2*. NPAS2 reguluje rytmickou expresi genu *Adcy1*, která vede ke zvýšení hladiny cAMP a regulaci kontrastní citlivosti. Převzato z Hwang et al., 2013.

4.4. Nitrooční tlak

U mnoha živočišných druhů včetně lidí byl popsán cirkadiánní rytmus změn hodnot nitroočního tlaku (Liu, 1998). U laboratorních potkanů byl pozorován přetrvávající cirkadiánní rytmus změn hodnot nitroočního tlaku i v konstantní tmě, což naznačuje, že by změny hodnot mohly být řízeny autonomním cirkadiánním systémem v retině (Moore et al., 1996). V roce 2006 bylo prokázáno, že u *Cry1/Cry2* KO myši k cirkadiánním změnám hodnot nitroočního tlaku nedochází, místo rytmických změn byla pozorována konstantně zvýšená (původně noční) hodnota (Maeda et al., 2006).

Několik studií prokázalo propojení hodnoty nitroočního tlaku s melatoninem, přičemž melatonin byl ve výsledcích těchto studií označen jako původce snížení hodnot nitroočního tlaku v nočních hodinách (Pintor et al., 2001). Tento fakt byl potvrzen i novější studií, která popsala zvýšení průměrné noční hodnoty nitroočního tlaku u MT1 receptorové KO myši oproti wild-type kontrole (Alcantara-Contreras et al., 2011). Denní hodnoty nitroočního tlaku se ale u MT1 KO myši nelišily, takže zůstává otázkou, co případně hraje roli ve spolupráci na cirkadiánních změnách hodnot nitroočního tlaku s melatoninem.

Zvýšený nitrooční tlak je jedním z nejpodstatnějších faktorů vzniku glaukomu, poškození zraku, které je druhou nejčastější příčinou slepoty na světě. Vzhledem k popsanému efektu melatoninu na snižování hodnoty nitroočního tlaku byly již vyvinuty experimentální modely glaukomických myší a potkanů, u kterých byl poměrně úspěšně melatonin využit v léčbě raných fází glaukomu (Belforte et al., 2010; Martínez-Águila et al., 2016). Je tedy otázkou, zda se tento, zatím teoretický, terapeutický postup bude moci uplatnit i u lidí.

4.5. Vnitřní retinální hodiny a retinální patofyziologie

Jak již bylo detailně popsáno výše, retinální cirkadiánní hodiny regulují několik velmi důležitých retinálních pochodů. Není proto divu, že pozornost vědců se po popsání klíčových mechanismů obrátila směrem k výzkumu možností propojení vnitřního retinálního cirkadiánního systému a patofyziologie retiny.

Bylo například prokázáno, že retinální cirkadiánní hodiny ovlivňují životnost fotoreceptorových buněk při jejich nepředvídaném osvětlení silným světlem (Organisciak et al., 2000), protože ztráta fotoreceptorových buněk byla výrazně vyšší v případě potkanů vystavených náhlému osvětlení v noční cirkadiánní fázi než u potkanů osvětlených během dne. Studie poškození nebo ztráty fotoreceptorů při náhlém osvětlení v závislosti na cirkadiánním rytmu nám zároveň dávají možnost pozorování pravděpodobných mechanismů lidských retinálních degenerací na zvířecích modelech (Organisciak and Vaughan, 2010).

5. Závěr

Většina fyziologických a behaviorálních funkcí člověka je adaptována na 24hodinový cirkadiánní rytmus. Unikátní roli v cirkadiánním systému, jinak většinově řízeném hlavním pacemakerem, lokalizovaným v SCN hypotalamu, hrají autonomní oscilátory, například autonomní cirkadiánní oscilátor v retině.

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout vědecké poznatky o cirkadiánním systému v retině savců. Z literární rešerše vyplynulo, že přestože některé mechanismy jsou již velmi dobře popsány (např. molekulární mechanismus základní hodinové smyčky, který dnes dokážeme díky strukturní krystalografii popsat téměř na úrovni atomů), o jiných toho víme doposud velmi málo. Věda se například shodne na tom, že neuromodulátory syntetizované v retinálních buňkách jsou klíčové pro řízení cirkadiánních rytmů v retině, ovšem bylo již publikováno několik různých modelů konkrétního mechanismu a žádný není s velkou pravděpodobností zcela přesný. Zatímco někteří přikládají největší význam melatoninu

a dopaminu, objevují se i výsledky, které uvádějí jako hlavní retinální cirkadiánní modulátor GABA. Ukazuje se, že cirkadiánně ovlivňovaný nitrooční tlak může být ve svém patologickém zvýšení snížen podáním melatoninu, což by mohlo mít využití v léčbě glaukomu u lidí. Velmi rychle se také vyvíjí výzkum na poli vlivu modrého světla na cirkadiánní rytmy. Současný svět je zaplněn obrazovkami a displeji mobilních zařízení, jejichž světlo ovlivňuje cirkadiánní rytmicitu uživatelů, a vyvstávají tak nové, velmi akutní otázky, kterými se věda před dvaceti lety nemusela zabývat.

Patrně největší otázkou v oblasti výzkumu cirkadiánního systému sítnice zůstávají různorodé výsledky týkající se lokalizace cirkadiánních hodin v retině. V literatuře jsou publikovány stále nové typy retinálních buněk, v nichž jsou exprimovány hodinové geny. Zůstává však otázkou, které konkrétní buňky řídí specifické cirkadiánně regulované retinální funkce (např. fagocytózu vnějších segmentů retiny, podpora fotopického a skotopického vidění, změny vizuální senzitivity a kontrastní citlivosti, změny hodnot nitroočního tlaku). Cirkadiánní systém retiny je pravděpodobně ještě komplexnější, než se doposud předpokládalo, a doufejme, že nás výzkum v příštích deseti letech posune v pochopení jeho funkcí dál.

6. Literatura

- Abrahamson, E.E., and Moore, R.Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research* 916, 172–191.
- Albrecht, U. (2012). Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. *Neuron* 74, 246–260.
- Alcantara-Contreras, S., Baba, K., and Tosini, G. (2011). Removal of melatonin receptor type 1 increases intraocular pressure and retinal ganglion cells death in the mouse. *Neuroscience Letters* 494, 61–64.
- Álvarez-López, C., Cernuda-Cernuda, R., Alcorta, E., Álvarez-Viejo, M., and Manuel García-Fernández, J. (2004). Altered endogenous activation of CREB in the suprachiasmatic nucleus of mice with retinal degeneration. *Brain Research* 1024, 137–145.
- Amir, S., and Stewart, J. (1996). Resetting of the circadian clock by a conditioned stimulus. *Nature* 379, 542–545.
- Aschoff, J., Fatranská, M., Giedke, H., Doerr, P., Stamm, D., and Wisser, H. (1971). Human Circadian Rhythms in Continuous Darkness: Entrainment by Social Cues. *Science* 171, 213–215.
- Balkema, G.W., Cusick, K., and Nguyen, T.-H. (2001). Diurnal variation in synaptic ribbon length and visual threshold. *Visual Neuroscience* 18, 789–797.
- Belforte, N.A., Moreno, M.C., De, Z., Sande, P.H., Chianelli, M.S., Keller, S., and Rosenstein, R.E. (2010). Melatonin: A novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma. *Journal of Pineal Research* 48, 353–364.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., and Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science* 295, 1070–1073.
- Besharse, J.C., and Dunis, D.A. (1983). Methoxyindoles and Photoreceptor Metabolism: Activation of Rod Shedding. *Science* 219, 1341–1343.
- Bobu, C., Sandu, C., Laurent, V., Felder-Schmittbuhl, M.-P., and Hicks, D. (2013). Prolonged light exposure induces widespread phase shifting in the circadian clock and visual pigment gene expression of the *Arvicantis ansorgei* retina. *Mol. Vis.* 19, 1060–1073.
- Bos, N.P.A., and Mirmiran, M. (1990). Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 511, 158–162.

- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P.M., Godinho, S.I.H., Draetta, G.F., and Pagano, M. (2007). SCFFbx13 Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Science* 316, 900–904.
- Cahill, G.M., and Besharse, J.C. (1991). Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. *J. Neurosci.* 11, 2959–2971.
- Calderone, J.B., and Jacobs, G.H. (1995). Regional variations in the relative sensitivity to UV light in the mouse retina. *Visual Neuroscience* 12, 463–468.
- Chen, W., and Baler, R. (2000). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Molecular Brain Research* 81, 43–50.
- Cho, H., Zhao, X., Hatori, M., Yu, R.T., Barish, G.D., Lam, M.T., Chong, L.-W., DiTacchio, L., Atkins, A.R., Glass, C.K., et al. (2012). Regulation of Circadian Behavior and Metabolism by Rev-erba and Rev-erbβ. *Nature* 485, 123–127.
- Collins, B., and Blau, J. (2006). Keeping Time without a Clock. *Neuron* 50, 348–350.
- Dallmann, R., Viola, A.U., Tarokh, L., Cajochen, C., and Brown, S.A. (2012). The human circadian metabolome. *PNAS* 109, 2625–2629.
- Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annual Review of Physiology* 72, 517–549.
- Doi, M., Hirayama, J., and Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell* 125, 497–508.
- Douris, N., Kojima, S., Pan, X., Lerch-Gaggl, A.F., Duong, S.Q., Hussain, M.M., and Green, C.B. (2011). Nocturnin regulates circadian trafficking of dietary lipid in intestinal enterocytes. *Curr. Biol.* 21, 1347–1355.
- Emran, F., Rihel, J., Adolph, A.R., and Dowling, J.E. (2010). Zebrafish larvae lose vision at night. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 6034–6039.
- Etingof, R.N. (1997). Light as the most important factor of evolution: Some molecular aspects. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 33, 492–504.
- Foster, R.G. (1998). Shedding Light on the Biological Clock. *Neuron* 20, 829–832.
- Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., Schantz, M. von, Muñoz, M., David-Gray, Z., and Foster, R. (1999). Regulation of Mammalian Circadian Behavior by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors. *Science* 284, 502–504.

- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., and Weitz, C.J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564–1569.
- Green, D.J., and Gillette, R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Research* 245, 198–200.
- Groos, G., and Hendriks, J. (1982). Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neuroscience Letters* 34, 283–288.
- Guido, M.E., Garbarino-Pico, E., Contin, M.A., Valdez, D.J., Nieto, P.S., Verra, D.M., Acosta-Rodriguez, V.A., de Zavalía, N., and Rosenstein, R.E. (2010). Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: Novel players in the circadian system. *Progress in Neurobiology* 92, 484–504.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., and Cermakian, N. (2005). Differential Control of Bmal1 Circadian Transcription by REV-ERB and ROR Nuclear Receptors. *J Biol Rhythms* 20, 391–403.
- Hannibal, J., Moller, M., Ottersen, O.P., and Fahrenkrug, J. (2000). PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J. Comp. Neurol.* 418, 147–155.
- Hiragaki, S., Baba, K., Coulson, E., Kunst, S., Spessert, R., and Tosini, G. (2014). Melatonin signaling modulates clock genes expression in the mouse retina. *PloS One* 9, e106819.
- Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., and Wong, R.O.L. (2014). Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 42, 44–84.
- Huang, N., Chelliah, Y., Shan, Y., Taylor, C.A., Yoo, S.-H., Partch, C., Green, C.B., Zhang, H., and Takahashi, J.S. (2012). Crystal Structure of the Heterodimeric CLOCK:BMAL1 Transcriptional Activator Complex. *Science* 337, 189–194.
- Hwang, C.K., Chaurasia, S.S., Jackson, C.R., Chan, G.C.-K., Storm, D.R., and Iuvone, P.M. (2013). Circadian Rhythm of Contrast Sensitivity Is Regulated by a Dopamine–Neuronal PAS-Domain Protein 2–Adenylyl Cyclase 1 Signaling Pathway in Retinal Ganglion Cells. *J. Neurosci.* 33, 14989–14997.
- Iuvone, P.M., Tosini, G., Pozdeyev, N., Haque, R., Klein, D.C., and Chaurasia, S.S. (2005). Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 24, 433–456.
- Jackson, C.R., Chaurasia, S.S., Hwang, C.K., and Michael Iuvone, P. (2011). Dopamine D4 receptor activation controls circadian timing of the adenylyl cyclase 1/cyclic AMP signaling system in mouse retina. *European Journal of Neuroscience* 34, 57–64.

- Jackson, C.R., Ruan, G.-X., Aseem, F., Abey, J., Gamble, K., Stanwood, G., Palmiter, R.D., Iuvone, P.M., and McMahon, D.G. (2012). Retinal Dopamine Mediates Multiple Dimensions of Light-Adapted Vision. *J Neurosci* 32, 9359–9368.
- Jacobs, G.H. (1993). The Distribution and Nature of Colour Vision Among the Mammals. *Biological Reviews* 68, 413–471.
- Jaliffa, C.O., Faillace, M.P., Lacoste, F.F., Llomovatte, D.W., Sarmiento, M.I.K., and Rosenstein, R.E. (1999). Effect of GABA on Melatonin Content in Golden Hamster Retina. *Journal of Neurochemistry* 72, 1999–2005.
- Jaliffa, C.O., Saenz, D., Resnik, E., Sarmiento, M.I.K., and Rosenstein, R.E. (2001). Circadian activity of the GABAergic system in the golden hamster retina. *Brain Res.* 912, 195–202.
- Klerman, E.B., Rimmer, D.W., Dijk, D.-J., Kronauer, R.E., Rizzo, J.F., and Czeisler, C.A. (1998). Nonphotic entrainment of the human circadian pacemaker. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 274, R991–R996.
- Ko, C.H., and Takahashi, J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15, R271–R277.
- Kochendoerfer, G.G., Lin, S.W., Sakmar, T.P., and Mathies, R.A. (1999). How color visual pigments are tuned. *Trends Biochem. Sci.* 24, 300–305.
- Konopka, R.J., and Benzer, S. (1971). Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 68, 2112–2116.
- Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J.S., and Schibler, U. (2007). System-Driven and Oscillator-Dependent Circadian Transcription in Mice with a Conditionally Active Liver Clock. *PLoS Biology* 5, 179–189.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., and Reppert, S.M. (1999). mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. *Cell* 98, 193–205.
- LaVail, M.M. (1980). Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19, 407–411.
- Lee, H.S., Nelms, J.L., Nguyen, M., Silver, R., and Lehman, M.N. (2003). The eye is necessary for a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Neuroscience* 6, 111.
- LeGates, T.A., Fernandez, D.C., and Hattar, S. (2014). Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nat Rev Neurosci* 15, 443–454.

- Lehman, M.N., Silver, R., Gladstone, W.R., Kahn, R.M., Gibson, M., and Bittman, E.L. (1987). Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J. Neurosci.* 7, 1626–1638.
- Liu, J.H.K. (1998). Circadian rhythm of intraocular pressure. *Journal of Glaucoma* 7, 141–147.
- Lockley, S.W., Skene, D.J., Arendt, J., Tabandeh, H., Bird, A.C., and DeFrance, R. (1997). Relationship between Melatonin Rhythms and Visual Loss in the Blind. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82, 3763–3770.
- Lucas, R.J., Douglas, R.H., and Foster, R.G. (2001). Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nature Neuroscience* 4, 621.
- Maeda, A., Tsujiya, S., Higashide, T., Toida, K., Todo, T., Ueyama, T., Okamura, H., and Sugiyama, K. (2006). Circadian intraocular pressure rhythm is generated by clock genes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 47, 4050–4052.
- Maggiore, V.D., and Ralph, M.R. (1999). Retinal GABAA Receptors Participate in the Regulation of Circadian Responses to Light. *J Biol Rhythms* 14, 47–53.
- Martínez-Águila, A., Fonseca, B., Lara, M.J.P. de, and Pintor, J. (2016). Effect of Melatonin and 5-Methoxycarbonylamino-N-Acetyltryptamine on the Intraocular Pressure of Normal and Glaucomatous Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 357, 293–299.
- McGlinchy, N.J., Valomon, A., Chesham, J.E., Maywood, E.S., Hastings, M.H., and Ule, J. (2012). Regulation of alternative splicing by the circadian clock and food related cues. *Genome Biology* 13, R54.
- McMahon, D.G., Iuvone, P.M., and Tosini, G. (2014). Circadian organization of the mammalian retina: From gene regulation to physiology and diseases. *Progress in Retinal and Eye Research* 39, 58–76.
- Meijer, J.H., and Rietveld, W.J. (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiological Reviews* 69, 671–707.
- Mills, S.L., Xia, X.-B., Hoshi, H., Firth, S.I., Rice, M.E., Frishman, L.J., and Marshak, D.W. (2007). Dopaminergic modulation of tracer coupling in a ganglion-amacrine cell network. *Visual Neuroscience* 24, 593–608.
- Mohawk, J.A., and Takahashi, J.S. (2011). Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in Neurosciences* 34, 349–358.
- Moore, R.Y. (1983). Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc* 42, 2783–2789.

- Moore, R.Y. (1997). Circadian rhythms: Basic neurobiology and clinical applications. *Annu. Rev. Med.* 48, 253–266.
- Moore, R.Y., and Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research* 42, 201–206.
- Moore, R.Y., and Lenn, N.J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* 146, 1–14.
- Moore, C.G., Johnson, E.C., and Morrison, J.C. (1996). Circadian rhythm of intraocular pressure in the rat. *Current Eye Research* 15, 185–191.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., and Patrick Card, J. (1995). The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 352, 351–366.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., and Leak, R.K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* 309, 89–98.
- Morin, L.P., and Allen, C.N. (2006). The circadian visual system. *Brain Research Reviews* 51, 1–60.
- Namihira, M., Honma, S., Abe, H., Masubuchi, S., Ikeda, M., and Honma, K. (2001). Circadian pattern, light responsiveness and localization of rPer1 and rPer2 gene expression in the rat retina. *Neuroreport* 12, 471–475.
- Nangle, S.N., Rosensweig, C., Koike, N., Tei, H., Takahashi, J.S., Green, C.B., and Zheng, N. (2014). Molecular assembly of the period-cryptochrome circadian transcriptional repressor complex. *eLife* 3, e03674.
- Nathans, J. (1999). The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron* 24, 299–312.
- Organisciak, D.T., and Vaughan, D.K. (2010). Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Progress in Retinal and Eye Research* 29, 113–134.
- Organisciak, D.T., Darrow, R.M., Barsalou, L., Kutty, R.K., and Wiggert, B. (2000). Circadian-Dependent Retinal Light Damage in Rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3694–3701.
- Panda, S., Hogenesch, J.B., and Kay, S.A. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417, 329.
- Partch, C.L., Green, C.B., and Takahashi, J.S. (2014). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in Cell Biology* 24, 90–99.

- Pintor, J., Martin, L., Pelaez, T., Hoyle, C.H.V., and Peral, A. (2001). Involvement of melatonin MT3 receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *European Journal of Pharmacology* 416, 251–254.
- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25, 159–184.
- Pozdeyev, N., Taylor, C., Haque, R., Chaurasia, S.S., Visser, A., Thazyeen, A., Du, Y., Fu, H., Weller, J., Klein, D.C., et al. (2006). Photic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase binding to 14-3-3 proteins in retinal photoreceptor cells. *J. Neurosci.* 26, 9153–9161.
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB α Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell* 110, 251–260.
- Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F., and Rollag, M.D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *Journal of Neuroscience* 20, 600–605.
- Provencio, I., Rollag, M.D., and Castrucci, A.M. (2002). Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature* 415, 493.
- Quan, F.-S. (2016). Dopaminergic amacrine cells in rabbit retina: a confocal microscopic study. *Int J Clin Exp Med* 2016;9(6):9073-9079 [Www.ijcem.com](http://www.ijcem.com) /ISSN:1940-5901/IJCEM0012419 2016.
- Raghuram, S., Stayrook, K.R., Huang, P., Rogers, P.M., Nosie, A.K., McClure, D.B., Burris, L.L., Khorasanizadeh, S., Burris, T.P., and Rastinejad, F. (2007). Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 1207–1213.
- Reick, M., Garcia, J.A., Dudley, C., and McKnight, S.L. (2001). NPAS2: An Analog of Clock Operative in the Mammalian Forebrain. *Science* 293, 506–509.
- Reischl, S., Vanselow, K., Westermarck, P.O., Thierfelder, N., Maier, B., Herzog, H., and Kramer, A. (2007). β -TrCP1-Mediated Degradation of PERIOD2 Is Essential for Circadian Dynamics. *J Biol Rhythms* 22, 375–386.
- Ruan, G.-X., Allen, G.C., Yamazaki, S., and McMahon, D.G. (2008). An Autonomous Circadian Clock in the Inner Mouse Retina Regulated by Dopamine and GABA. *PLOS Biol* 6, e249.
- Sakamoto, K., Oishi, K., Shiraishi, M., Hamano, S., Otsuka, H., Miyake, Y., and Ishida, N. (2000). Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina. *Neuroreport* 11, 3995–3997.

- Sampath, A.P., and Rieke, F. (2004). Selective Transmission of Single Photon Responses by Saturation at the Rod-to-Rod Bipolar Synapse. *Neuron* 41, 431–443.
- Sanes, J.R., and Masland, R.H. (2015). The Types of Retinal Ganglion Cells: Current Status and Implications for Neuronal Classification. *Annual Review of Neuroscience* 38, 221–246.
- Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A., and Hogenesch, J.B. (2004). A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock. *Neuron* 43, 527–537.
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y., and Frenette, P.S. (2013). Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol* 13, 190–198.
- Stephan, F.K., and Zucker, I. (1972). Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *PNAS* 69, 1583–1586.
- Stradleigh, T.W., Ogata, G., Partida, G.J., Oi, H., Greenberg, K.P., Krempely, K.S., and Ishida, A.T. (2011). Colocalization of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel subunits in rat retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 519, 2546–2573.
- Szél, Á., Röhlich, P., Gaffé, A.R., Juliusson, B., Aguirre, G., and Van Veen, T. (1992). Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 325, 327–342.
- Tamaru, T., Hattori, M., Honda, K., Nakahata, Y., Sassone-Corsi, P., Horst, G.T.J. van der, Ozawa, T., and Takamatsu, K. (2015). CRY Drives Cyclic CK2-Mediated BMAL1 Phosphorylation to Control the Mammalian Circadian Clock. *PLOS Biol* 13, e1002293.
- Tassi, P., and Pins, D. (1997). Diurnal rhythmicity for visual sensitivity in humans? *Chronobiology International* 14, 35–48.
- Toh, K.L., Jones, C.R., He, Y., Eide, E.J., Hinz, W.A., Virshup, D.M., Ptáček, L.J., and Fu, Y.-H. (2001). An hPer2 Phosphorylation Site Mutation in Familial Advanced Sleep Phase Syndrome. *Science* 291, 1040–1043.
- Tosini, G., and Menaker, M. (1996). Circadian Rhythms in Cultured Mammalian Retina. *Science* 272, 419–421.
- Tosini, G., Davidson, A.J., Fukuhara, C., Kasamatsu, M., and Castanon-Cervantes, O. (2007). Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J* 21, 3866–3871.
- Tosini, G., Baba, K., Hwang, C.K., and Iuvone, P.M. (2012). Melatonin: An underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Exp. Eye Res.* 103, 82–89.

- Tosini, G., Laurent, V., Baba, K., Hiragaki, S., Contreras-Alcantara, S., and Hicks, D. (2013). Modulation of the Daily Rhythm in Disc Shedding by Melatonin in the Mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 2648–2648.
- Vanselow, K., Vanselow, J.T., Westermarck, P.O., Reischl, S., Maier, B., Korte, T., Herrmann, A., Herzog, H., Schlosser, A., and Kramer, A. (2006). Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev.* 20, 2660–2672.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.-M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W., and Takahashi, J.S. (1994). Mutagenesis and Mapping of a Mouse Gene, *Clock*, Essential for Circadian Behavior. *Science* 264, 719–725.
- Wald, G. (1933). Vitamin A in the retina. *Nature* 132, 316–317.
- Wang, Y., Osterbur, D.L., Megaw, P.L., Tosini, G., Fukuhara, C., Green, C.B., and Besharse, J.C. (2001). Rhythmic expression of Nocturnin mRNA in multiple tissues of the mouse. *BMC Developmental Biology* 1, 1–15.
- Wassle, H., and Boycott, B.B. (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews* 71, 447–480.
- Weaver, D.R. (1998). The Suprachiasmatic Nucleus: A 25-Year Retrospective. *J Biol Rhythms* 13, 100–112.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annu Rev Physiol* 72, 551–577.
- Wiechmann, A.F., Yang, X.-L., Wu, S.M., and Hollyfield, J.G. (1988). Melatonin enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina. *Brain Research* 453, 377–380.
- Witkovsky, P. (2004). Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* 108, 17–39.
- Xu, L., Ruan, G., Dai, H., Liu, A.C., Penn, J., and McMahon, D.G. (2016). Mammalian retinal Müller cells have circadian clock function. *Mol Vis* 22, 275–283.